# 日本国特許庁 JAPAN PATENT OFFICE

09.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

·出 願 年 月 日
Date of Application:

2003年12月16日

出 願 番 号 Application Number:

特願2003-418173

[ST. 10/C]:

[JP2003-418173]

出 願 人
Applicant(s):

キヤノン株式会社

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office 2005年 1月21日

1) [1]



【書類名】 特許願 【整理番号】 258904 【提出日】 平成15年12月16日 特許庁長官 殿 【あて先】 GO1N 21/64 【国際特許分類】 【発明者】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 【住所又は居所】 【氏名】 西馬 聡 【特許出願人】 【識別番号】 000001007 キヤノン株式会社 【氏名又は名称】 【代理人】 【識別番号】 100123788 【弁理士】 【氏名又は名称】 宮崎 昭夫 【電話番号】 03-3585-1882 【選任した代理人】 【識別番号】 100088328 【弁理士】 【氏名又は名称】 金田 暢之 【選任した代理人】 【識別番号】 100106297 【弁理士】 【氏名又は名称】 伊藤 克博 【選任した代理人】 【識別番号】 100106138 【弁理士】 【氏名又は名称】 石橋 政幸 【手数料の表示】 【予納台帳番号】 201087 【納付金額】 21,000円 【提出物件の目録】 特許請求の範囲 1 【物件名】 【物件名】 明細書 1 【物件名】 図面 1 【物件名】 要約書 1

# 【書類名】特許請求の範囲

# 【請求項1】

内部で光を伝搬させる光伝搬体と、

前記光伝搬体の外側面部に被検出物質が付着したときに前記伝搬体の一端から導光され、前記光伝搬体中を伝搬する励起光により、前記被検出物質が励起されて生じる蛍光と前記励起光とを、前記光伝搬体の他端において分光するための分光手段と、

前記分光手段よって分光された前記蛍光を検知する検知手段と、を備えることを特徴と する被検出対象の光学分析装置。

# 【請求項2】

前記分光手段が、前記光伝搬体の前記出力端に設けられた回折格子である請求項1に記載 の光学分析装置。

### 【請求項3】

前記入力端の側面から前記伝搬体に光を導光することを特徴とする請求項1または2に記載の光学分析装置。

### 【請求項4】

前記伝搬体を覆い、且つ、前記被検出物質を注入するための注入口と排出するための排出口とを有する流路を、更に有することを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の光学分析装置。

# 【請求項5】

前記光伝搬体の前記一端は、前記励起光を前記光導波路と結合させるための手段を更に有し、

前記結合手段が、回折格子であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の 光学分析装置。

### 【請求項6】

蛍光物質と結合した前記被検出対象を捕捉するための捕捉成分が、前記光伝搬体の外側に 付着し得ることを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の光学分析装置。

# 【請求項7】

前記被検出物質と前記捕捉成分との結合が、抗原抗体反応によるものであることを特徴と する請求項6記載の光学分析装置。

### 【請求項8】

前記被検出対象と前記捕捉成分との結合が、DNAのハイブリダイゼーション反応によるものであることを特徴とする請求項6記載の光学分析装置。

# 【書類名】明細書

【発明の名称】光学分析装置

# 【技術分野】

# [0001]

本発明は、一般的には化学および生化学分析のための光学的方法による分析装置に関し、特に、エバネッセント波を基本とした化学および生化学分析のための光学分析装置に関する。

# 【背景技術】

### [0002]

血液中には、ガンや肝炎など特定の疾患に対するマーカーが複数存在している。罹患した際、平時より特定のタンパク質の濃度が増加する。これらを平時からモニターしておくことで、重大な病気を早期に発見することが出来るため、次世代の医療技術として期待されている。未加工で未精製のタンパク質を分析するための方法の1つは、生物学的なリガンドー受容体相互作用を利用して特定の化合物を識別するセンサーを基本としたものである。そのような手法を用いているものには、光ファイバーのエバネッセント波センサー、および表面プラズモン共鳴センサーが含まれる。

### [0003]

光ファイバーのエバネッセント波センサーは、エバネッセント波(電界)効果を利用するものである。バネセント波(電界)効果とは、ある物質中を通過して誘電性の界面で反射される電磁波は、その界面の反対側にある第2の物質中で指数関数的に減衰する電界を生じることを言う。第2の物質中への浸透深さであるエバネッセント波の生じる領域は波長のごく一部ではあるが、それでもサイズとしては光または蛍光を生じるレポーター分子、光吸収ないし散乱分子、およびコロイド粒子やミクロスフィアのような光学的ラベル物質よりも大きい。これらのラベルはエバネッセント波の生じる領域において光学的変化を発生またはモニターすること、あるいは隣接する誘電体における光の伝播を変更させるために使用することが可能であり、表面近傍にあるターゲット物質を、検出することができる。

# [0004]

光ファイバーを用いたエバネッセント波センサーとしては、特公平5-21185号公報や特開2002-257732号公報等に記載されている。

### [0005]

これらに記載されている、エバネッセント波センサーは、一端が反射面となっている光ファイバーの側壁に標識化した抗原抗体複合体を付着させ、光ファイバーの他端から励起光を軸方向に導光している。光ファイバーに導光された励起光のバネセント波効果により、光ファイバーの側壁に付着した抗原抗体複合体の標識は、励起され蛍光を発生する。発した蛍光の一部が、該光ファイバーに導光され、励起光の反射光とともに光学系に戻り、光センサーによって検出されている。

【特許文献1】特公平5-21185

【特許文献2】特開2002-257732

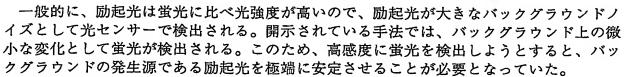
### 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

### [0006]

しかしながら、特公平5-21185号公報や特開2002-257732号公報に記載されたものでは、抗原抗体から発した蛍光と端面で反射された励起光とが一緒に光ファイバーから導出される。このために、蛍光の測定を行う場合、光ファイバー端から導出される光から、励起光と蛍光とを分離する必要がある。上記に開示されている手法では、励起光をカットし蛍光を通すようなフィルターを用いることにより分離をおこなっている。しかし、励起光を100%カットし蛍光を100%通すようなフィルターを製作することは実質的に困難である。

### [0007]



### [0008]

さらに、従来技術では、励起光を光導波路内に導入する際、光ファイバー径の四分の一 以下の径で点光源を作成して光ファイバーの端面導光にする必要がある。

# [0009]

位置合わせに厳密さが要求される為に、光源と光導波路とを一体化しておく必要があった。このために、検体が多くなると、大量の光源を準備する必要があった。

# 【課題を解決するための手段】

### [0010]

上記に挙げた課題は、以下に示す本発明によって解決される。内部で光を伝搬させる光伝搬体と、光伝搬体の外側面部に被検出物質が付着したときに伝搬体の一端から導光され、光伝搬体中を伝搬する励起光により、被検出物質が励起されて生じる蛍光と前記励起光とを、前記光伝搬体の他端に設けられた回折格子により分光する分光手段と、分光手段よって分光された前記蛍光を検知する検知手段と、を備えることを特徴とする被検出対象の光学分析装置である。

# [0011]

光伝搬体の一端は、励起光を光導波路と結合させるための手段を更に有し、前記結合手段が、回折格子であることが好ましく、蛍光物質を有する被検出対象を捕捉するための捕捉成分が、光伝搬体の外側に付着し得ることが好ましい。

### [0012]

更に、被検出物質と前記捕捉成分との結合が、抗原抗体反応あるいはDNAのハイブリダイゼーション反応によるものであることが好ましい。

# 【発明の効果】

### [0013]

本発明により、容易に構築できる光源から導波路に効率よく励起光を導入することが出来る。また、蛍光体を励起する励起光と蛍光体から発せられる蛍光を完全に分離することが出来、より高感度な蛍光免疫センサーを提供することが出来る。

### 【発明を実施するための最良の形態】

### [0014]

本発明は、光を伝搬する伝搬体となる光導波路を、流路を貫通するように形成し、該光導波路の一端から励起光を導光し、光導波路内を伝搬する励起光により、励起された光導波路の外部側壁に付着させた被検出物質が発する蛍光と励起光とを他端から出力される、蛍光と励起光とから、蛍光を分光し、分光された蛍光の強度により前記被検出物質の濃度を分析する光分析装置である。

### [0015]

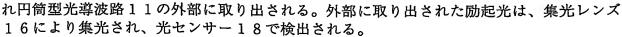
以下、図を参照しながら本発明に関わる4つの実施形態につき述べる。ここでは本発明を完全に理解してもらうため、特定の実施形態について詳細な説明をおこなうが、本発明はここに記した内容に限定されるものではない。

### [0016]

本発明第1の実施形態について、図1を参照しながら説明する。

### [0017]

円筒型光導波路11は、密封された流路20内に設置される。円筒型光導波路11の、流路20から突出している端部には、回折格子12、13が形成されている。光源15から照射される励起光は、コリメーターレンズ14で並行光に変換され、円筒型光導波路11の一端に全反射条件で回折格子13により、カップリングさせ、円筒型光導波路11内を、円筒型光導波路11の使端で反射しながら伝播する。円筒型光導波路11の他端まで伝播した励起光は、円筒型光導波路11の他端に形成された回折格子12によって分光さ



# [0018]

円筒型光導波路11の外壁に付着した検体が有する蛍光体色素は、円筒型光導波路11に全反射条件で導光された励起光のエバネッセント光により励起され蛍光を発する。この蛍光は、一部が円筒型光導波路11に取り込まれ、円筒型光導波路11を伝播して円筒型光導波路11の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された蛍光は、集光レンズ17により集光され、光センサー19で検出される。

# [0019]

円筒型光導波路 1 1 としては、励起光に対して伝搬ロスが少ない材料からなる光ファイバーであることが好ましく、そのような材料としては、ポリスチレン(PS)、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)、ポリカーボネート(PC)を用いることが好ましい。 回 折格子 1 2 , 1 3 としては、ブラッグ回折格子、ブレーズド回折格子、ホログラフィー回 折格子を用いることができる。本構成では、ブラッグ回折格子を用いることが好ましい。ブラッグ回折格子は透過型の回折格子で、ホログラフィー回折格子、ブレーズド回折格子は反射型である。

# [0020]

コリメーターレンズ14としては、平凸レンズ、セルフォックレンズ、非球面レンズ、 両凸レンズを用いることができる。本構成では、平凸レンズ、セルフォックレンズ、非球 面レンズを用いることが望ましい。両凸レンズは、光を平行化(コリメート)するための レンズではないので、平行化の目的に使うには少し工夫が必要なので、好ましい形態から は外している。

# [0021]

光源15としては、波長が200nm~1000nmの範囲のレーザーダイオードまたはガスレーザーを選択して用いる。本構成では波長が670nm以下のものを用いることが好ましい。

### [0022]

集光レンズ16、17としては、平凸シリンダーレンズ、平凹シリンダーレンズ、非球面レンズ、平凸もしくは両凸球面レンズ群、顕微鏡用対物レンズ、セルフォックレンズを用いることが出来る。本構成では平凸シリンダーレンズまたは平凹シリンダーレンズ、非球面レンズを用いることが好ましい。平凸、両凸では、レンズ群を構成する必要があるため構造が複雑になり、セルフォックレンズでは本構成では損失が大きくなり感度が低下する。

# [0023]

光センサー18,19としては、フォトダイオード、光電子増倍管を用いることができる。本構成では、検体の濃度によってフォトダイオード、光電子増倍管が適宜選択される

### [0024]

流路20としては、円筒型のキャピラリー、チューブが用いられるが円筒型のキャピラリーが好ましい。

### [0025]

注入口/排出口21,22については、流路20に貫通孔を開けパイプを挿入し、チューブを伸ばした構成が好ましい。以下の実施の形態においても同様であるが、注入口/排出口は、図面では一ヶ所で説明しているが、注入口/排出口ともに複数設けることも、一方のみを複数にすることもできることは言うまでもない。

### [0026]

本発明の第2の実施形態について、図2を参照しながら説明する。第1の実施形態で示したものと同じ要素については、同じ符号で示してある。ただし、同じ構成要件であっても異なる形状や材料の要素である場合は、異なる符号をつけて説明する。

# [0027]

第1の実施の形態と異なっている点は、導波路を、円筒型光導波路11に変えて平面型 光導波路23を用いた点である。

# [0028]

第1の実施の形態と同様に、光源15から照射される励起光は、コリメーターレンズ14で並行光に変換され、平面型光導波路23の一端に全反射条件でカップリングさせ、平面型光導波路23内を、平面型光導波路23の壁面で反射しながら伝播する。平面型光導波路23の他端まで伝播した励起光は、平面型光導波路23の他端に形成された回折格子12によって分光され平面型光導波路23の外部に取り出される。外部に取り出された励起光は、集光レンズ16により集光され、光センサー18で検出される。

### [0029]

平面型光導波路23の外壁に付着した検体が有する蛍光体色素は、平面型光導波路23に導光された励起光による、エバネッセント光により励起し蛍光を発する。この蛍光は、一部が平面型光導波路23に取り込まれ、平面型光導波路23を伝播して平面型光導波路23の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された蛍光は、集光レンズ17により集光され、光センサー19で検出される。

# [0030]

平面型光導波路23としては、励起光に対して光ロスが少ない材料であることが好ましく、ポリスチレン(PS)、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)、ポリカーボネート(PC)を用いることが好ましい。

# [0031]

本発明の第3の実施の形態について、図3を参照しながら説明する。第1の実施形態で示したものと同じ要素については、同じ符号で示してある。ただし、同じ構成要件であっても異なる形状や材料の要素である場合は、異なる符号をつけて説明する。

### [0032]

第3の実施の形態と第1の実施の形態との違いは、円筒型光導波路11の励起光が導光される側の端部の回折格子13に変えて、光源15からの射出光が、円筒型光導波路11 に全反射条件で導光されるような角度でカットされ、ミラー24が形成されている点である。

# [0033]

光源15から照射される励起光は、コリメーターレンズ14で並行光に変換され、円筒型光導波路11の一端に形成されたミラー24に全反射条件でカップリングさせ、円筒型光導波路11内を、円筒型光導波路11の壁面で反射しながら伝播する。円筒型光導波路11の他端まで伝播した励起光は、円筒型光導波路11の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された励起光は、集光レンズ16により集光され、光センサー18で検出される。

### [0034]

円筒型光導波路11の外壁に付着した検体が有する蛍光体色素は、円筒型光導波路11に導光された励起光による、エバネッセント光により励起し蛍光を発する。この蛍光は、一部が円筒型光導波路11に取り込まれ、円筒型光導波路11を伝播して円筒型光導波路11の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された蛍光は、集光レンズ17により集光され、光センサー19で検出される。

### [0035]

ミラー24としては、円筒型導波路11を、光の伝搬方向に対して10°~50°の範囲でカットし、端面を研磨した全反射ミラー、金属膜を蒸着したミラー、ミラーを張り合わせた構造、およびそれらの組み合わせを用いることができる。本構成では研磨面にA1、Ag、AuまたはCrを蒸着し、ミラーにした構成が望ましい。

### [0036]

本発明の第4の実施形態について、図4を参照しながら説明する。第1の実施形態で示したものと同じ要素については、同じ符号で示してある。ただし、同じ構成要件であっても異なる形状や材料の要素である場合は、異なる符号をつけて説明する。

# [0037]

第4の実施の形態と第3の実施の形態との違いは、導波路を円筒型導波路11に変えて、平面型光導波路25に変えた点にある。平面型光導波路23の励起光が導光される端面には、第3の実施形態の円筒型導波路11と同様にミラー25が形成されている。

# [0038]

光源15から照射される励起光は、コリメーターレンズ14で並行光に変換され、平面型光導波路23の一端に形成されたミラー25に全反射条件でカップリングさせ、平面型光導波路23内を、円筒型光導波路11の壁面で反射しながら伝播する。

# [0039]

平面型光導波路の平面に対し、10°~50°の範囲でカットし、端面を研磨した全反射ミラー、金属膜を蒸着したミラー、ミラーを張り合わせた構造、およびそれらの組み合わせを用いることができる。平面型光導波路23の他端まで伝播した励起光は、平面型光導波路23の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された励起光は、集光レンズ16により集光され、光センサー18で検出される。

# [0040]

平面型光導波路23の外壁に付着した検体が有する蛍光体色素は、円筒型光導波路11に導光された励起光による、エバネッセント光により励起し蛍光を発する。この蛍光は、一部が円筒型光導波路11に取り込まれ、円筒型光導波路11を伝播して円筒型光導波路11の他端に形成された回折格子12によって分光され円筒型光導波路11の外部に取り出される。外部に取り出された蛍光は、集光レンズ17により集光され、光センサー19で検出される。

### [0041]

平面型光導波路23としては、ポリスチレン (PS)、ポリメタクリル酸メチル (PM MA)、ポリカーボネート (PC) を用いることができる。本構成では、PS, PMMA またはPCを用いることが好ましい。

### [0042]

本発明の、上記の第1~第4の実施の形態では、光導波路に導光された励起光が、光の入射面に戻らないので、励起光の戻り光による、発光光源の出力変動が抑制され、本願発明の課題を解決するものである。出力端に回折格子を形成すると端面から出力させるよりも励起光が出力端で反射されなくなる。出力端に回折格子を形成し、更に、出力端の反射を抑制する為に出力端を、光を吸収する端面にすることがさらに好ましい。

### [0043]

また、光の入力端と出力端とはともに流路から突出し、側面から光を導光、導出するので、端面から光を導光する際の光の口径、位置合わせを従来技術ほど厳密にあわせる必要がないために、流路と光導波路とが組み合わせられた光分析用装置用チップを大量に用意し、光源と検出装置とからなる分析装置に光分析用装置用チップを配することで分析を行うことができる。

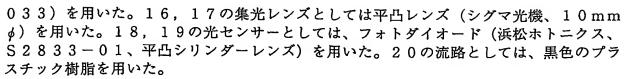
### 【実施例】

### [0044]

以下本発明の実施例を述べるが、本発明はここに記述した内容だけに制限を受けるものではない。

### (実施例1)

図1を参照しながら説明する。11の円筒型光導波路としては、両端に導波用の回折格子12と分光用の回折格子13をそれぞれ設けてある直径が約1mm、長さが40mmのPS製の棒を用いた。14のコリメートレンズとしては、平凸レンズ(シグマ光機、5mmø)を用いた。15の光源としては、レーザーダイオード(三洋電機、DL3038-



### [0045]

光導波路を濃度が $1 \times 10^{-7}$  mol/LのCy5 (Amersham Biosciences社(米)製品の蛍光色素)溶液に浸漬したあと、完成した光学系に設置した。レーザーダイオードからレーザー光(波長:約638 nm、実効強度:3 mW、135 Hzの矩形波で変調)を導入したところ、光導波路表面の蛍光がエバネッセント光により励起され、回折格子により励起光と蛍光が分光され、フォトダイオードで高感度に検出されることが確認された。

次に、前立腺癌のマーカーとして知られているPSAの検出を試みる。まず光導波路表面 にストレプトアビジンを付着させる。それからビオチン修飾したPSA抗体を吸着させ、 免疫センサーを用意し蛍光分析装置にセットする。そして次のプロトコールをおこなう。

- (1) Cy5色素で蛍光標識した抗体を流路に導入し、5分間インキュベートする。
- (2) 標識抗体を抜き取り、リン酸緩衝液で洗浄する。
- (3) 抗原であるタンパク質が混入している溶液を流路に導入し、5分間インキュベート する。
- (4) 抗原溶液を抜き取り、リン酸緩衝液で洗浄する。
- (5) 標識抗体を流路に導入し、5分間インキュベートする。
- (6) 標識抗体を抜き取り、リン酸緩衝液で洗浄する。
- (7)リン酸緩衝液を流路に注入する。

### [0046]

(7) の操作のあとレーザー光を導入し、PSAたんぱく質の濃度を測定すると、0.1 ng/mLまで非常に感度よく測定されることが確認された。

### [0047]

# (実施例2)

実施例1で使用した光学系を用いて、DNAのハイブリダイゼーション測定をおこなった。光導波路表面にストレプトアビジンを付着させ、ビオチン修飾した20量体プロープDNAを吸着し、免疫センサーを用意した。そして次のプロトコールをおこなった。

- (1)塩基配列が固定DNA(プローブ)と対応する捕捉DNA(ターゲットT1,20量体)にCy5色素で蛍光標識した複合体と、塩基配列が一つだけ異なっている20量体DNA(ターゲットT2,20量体)をCy3色素で標識した複合体が混入している検体液を用意する。
- (2) 検体液を流路に導入した後、5分間インキュベートする。
- (3) 検体を抜き取り、リン酸緩衝液で洗浄する。
- (4) リン酸緩衝液を流路に注入する。

### [0048]

(3)の操作のあとレーザー光を導入し、蛍光強度を測定すると、DNA(ターゲットT1,20量体)の濃度1nMまで感度よく測定されることが確認された。蛍光のスペクトルを分光器(不図示)で測定してみると670nm付近にピークをもつ色素のみが蛍光を発していることが確認され、T1のDNAだけが特異的に結合していることが確認された。

# 【図面の簡単な説明】

### [0049]

- 【図1】本発明の第1の実施の形態を示す概略図である。
- 【図2】本発明の第2の実施の形態を示す概略図である。
- 【図3】本発明の第3の実施の形態を示す概略図である。
- 【図4】本発明の第4の実施の形態を示す概略図である。

# 【符号の説明】

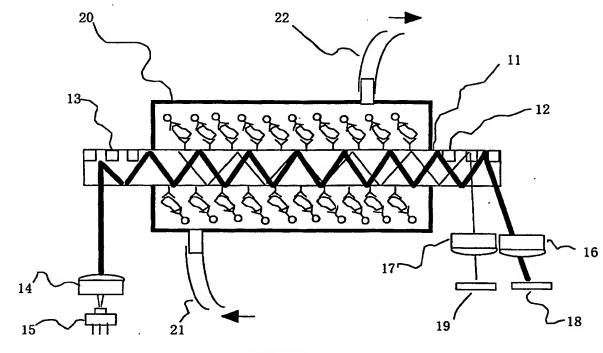


# [0050]

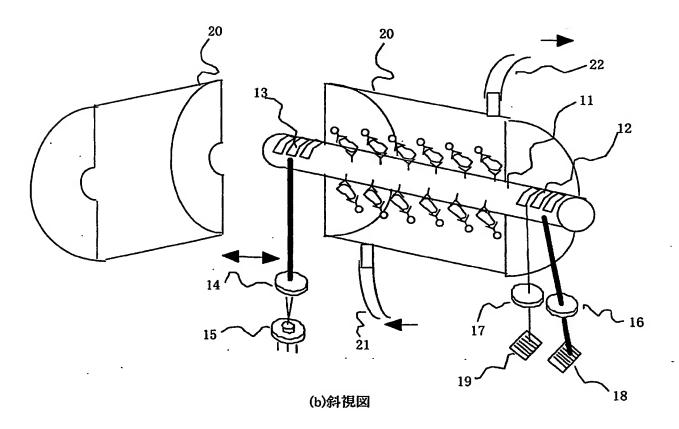
- 11 円筒型光導波路
- 12、13 回折格子
- 14 コリメーターレンズ
- 15 光源
- 16、17 集光レンズ
- 18、19 光センサー
- 20 流路
- 21、22 注入口/排出口
- 23 平面型光導波路
- 24、25 ミラー



【書類名】図面 【図1】

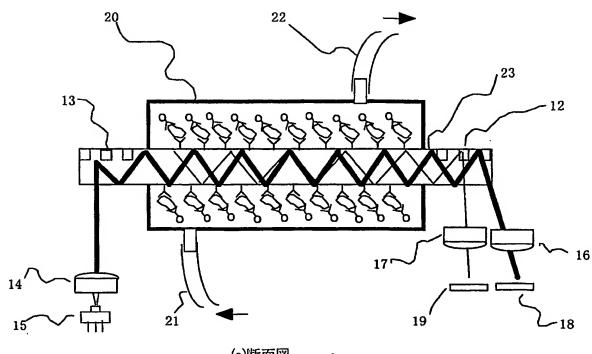


(a)断面図

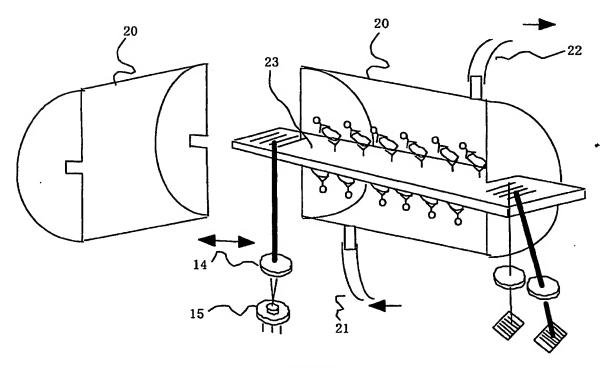




【図2】



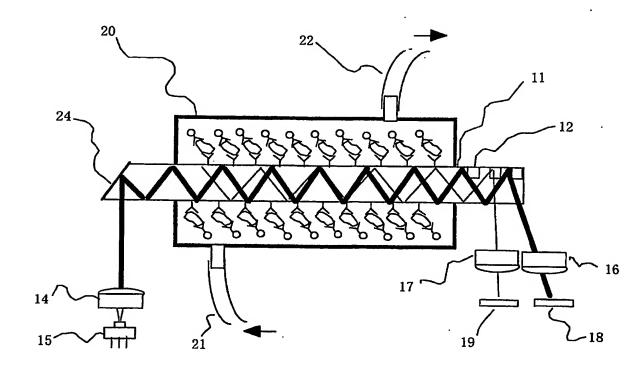
(a)断面図



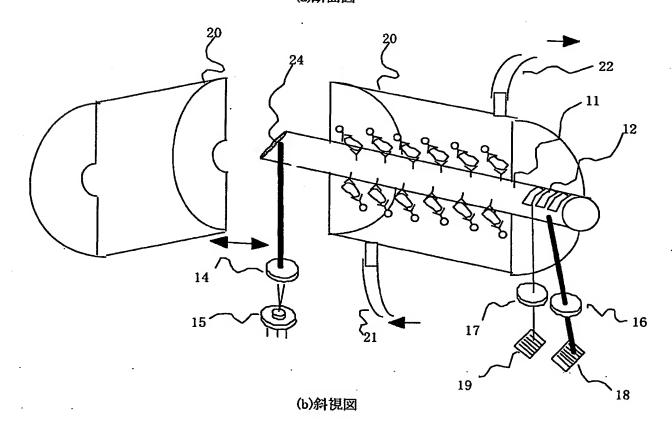
(b)斜視図



【図3】

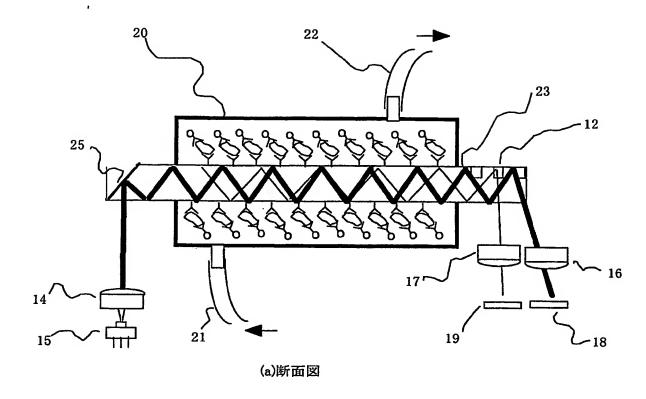


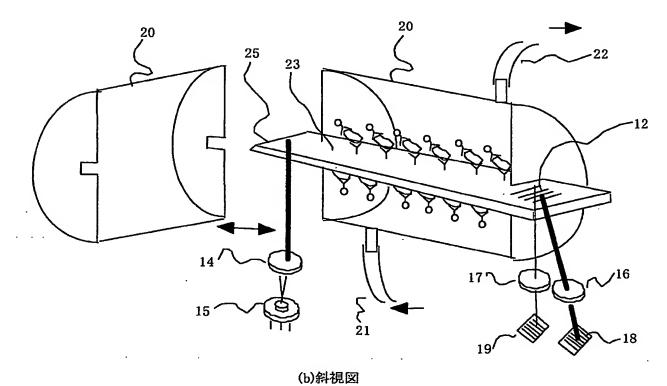
(a)断面図





【図4】







# 【書類名】要約書

【要約】

【課題】光伝搬体を用いた化学センサーにおいて、励起光と蛍光を完全に分離し、励起光によるバックグラウンドをなくし感度を向上させる。

【解決手段】 光伝搬体の一端から励起光が導光され、光伝搬体中を伝搬する励起光により、被検出物質が励起されて生じる蛍光と励起光とを、光伝搬体の他端に設けられた回折格子により分光することを特徴とする被検出対象の光学分析装置である。

【選択図】 図1



特願2003-418173

出願人履歴情報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日 [変更理由]

1990年 8月30日

変更理由] 新規登録 住 所 東京都大

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018772

International filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP

Number: 2003-418173

Filing date: 16 December 2003 (16.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)

